

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590748

研究課題名（和文） A I H の発症進展へのスルファチド反応性 N K T 2 細胞、インスリン抵抗性の関与の解析

研究課題名（英文） The participation of NKT2 cell and insulin resistance in the pathogenesis of autoimmune hepatitis.

研究代表者

高橋宏樹（HIROKI TAKAHASHI）

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：80256403

研究成果の概要（和文）：

自己免疫性肝炎（AIH）の発症進展への NKT2 細胞、インスリン抵抗性の関与を明らかにする目的で検討を行い、以下の結果を得た。

- ① 肝炎の病態形成に NKT1 細胞が、その回復に NKT2 細胞が関与している可能性が示された。
- ② NKT1/NKT2 バランスは肝内 Treg、CD8 細胞の動態には影響を及ぼさないことが示された。
- ③ 肝炎期では CD4、CD8 細胞における DAMP 受容体 RAGE、TLR4、TLR9 発現増強、NKT1、NKT2 細胞における RAGE、TLR9 の発現増強、Treg における RAGE、TLR9 の発現増強を認め、これら発現増強は炎症性サイトカインにより誘導された。
- ④ IR が肝炎慢性化に、CD4 による Th1 サイトカイン産生増強、NKT 細胞数増加、Th1 系サイトカイン産生増強を介して影響する可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

To make clear the role of NKT2 cell and insulin resistance in the pathogenesis of autoimmune hepatitis, we performed our study and revealed following newly identified points.

1. NKT1 cell participated in active phase of AIH, on the contrary NKT2 cell participate in recovery phase of AIH.
2. The balance of NKT1 and NKT2 did not influence on the profile of intrahepatic CD8 nor regulatory T cells (Treg).
3. In active phase of AIH, the expression of DAMP receptor RAGE、TLR4、TLR9 were increased on CD4、CD8 cell, RAGE、TLR9 were increased on NKT1、NKT2 cell and Treg cells. This increase was mediated by inflammatory cytokines.
4. Insulin resistance participated in the chronic inflammation of AIH by enhancing Th1 cytokine production by CD4 cell and increasing number of NKT cell and enhancing Th1 cytokine production by NKT cell.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：消化器病学

科研費の分科・細目：肝臓学

キーワード：自己免疫性肝炎、NKT2 細胞、DAMP、インスリン抵抗性

1. 研究開始当初の背景

自己免疫性肝炎 (AIH) の発症進展機序の詳細は未だ不明で、経過中にしばしばみられる寛解、再燃の機序も明らかでない。そのため免疫抑制剤を用いた治療の継続を余儀なくされるが、その副作用は臨床的に大きな問題となり、病態解明による新たな治療法開発が望まれる。

我々はこれまでの継続した AIH の病態解析の過程で、ヒト AIH では肝細胞膜に存在する糖脂質スルファチドに対する抗体が疾患特異的に存在することを見出した (Hepatology 1990;12:664)。また、樹状細胞と高分化型肝癌細胞の融合細胞の免疫によるマウス AIH モデルを作製したが (Clinical Immunol 2005;117:280)、このモデルでは肝細胞特異的細胞障害性 T 細胞により惹起される肝障害が時間経過とともに改善し、その際に肝内で制御性 T 細胞 (Treg) が増加することを明らかにした (Hepatology 2008;48:997A)。

一方、アデイボカインと病態の関連の検討で、ヒト AIH 症例ではステロイド服用の有無に関わらずインスリン抵抗性 (IR) がみられることを見出した。

以上の研究結果は

(1) 抗スルファチド抗体が AIH の病態形成にどのように関わるか？

(2) モデルでは発症初期に肝内 Treg 増加をともなう寛解がみられるのに、ヒト AIH ではなぜ病態が慢性化するか？

(3) インスリン抵抗性が AIH の病態形成にどのように影響するか？

といった疑問を投げかけてくる。

近年の研究により、これらの疑問を解くヒントとなる、(1) スルファチドをリガンドとする type2 NKT 細胞 (NKT2) が存在し、type1 NKT 細胞 (NKT1) や Treg と相互作用を示し免疫環境の形成に関わる、(2) 自己免疫疾患の慢性化に、ネクロシス細胞から逸脱した細胞内成分 (DAMP) による抗原非特異的免疫反応が関与する可能性がある、(3) IR の病態形成には脂肪組織内に浸潤した CD8 細胞や Treg が関与し、IR により惹起される免疫環境変化が自己免疫疾患の病態形成に影響を及ぼす可能性があ

る といった事実が報告された。

こうした背景をもとに、本研究では AIH の新たな治療法の開発を念頭に置きつつ以下の検討を行い、上述した疑問点の解決を試みた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、自己免疫性肝炎 (AIH) の病態について

(1) 発症への 新たな NKT サブセット NKT2 の関与、Hedgehog シグナルの NKT2 増殖への関与

(2) 慢性化への ネクロシス細胞由来の DAMP で活性化される抗原非特異的免疫反応の関与

(3) 慢性化・増悪と インスリン抵抗性の関連

の各点から解明し、発症・進展および寛解・再燃機序の解明を試みることである。

3. 研究の方法

(1) AIH 発症への NKT2 の関与と Hedgehog シグナルによる NKT1/NKT2 バランス制御の解析

① AIH モデルを用い発症時 NKT1/NKT2 バランス動態、Treg との関連を明らかにする
② 同モデルを用い、NKT1/NKT2 バランス形成への Hedgehog シグナルの関与を検討

(2) AIH 慢性化への DAMP の関与の解析と HMGB1 阻害剤を用いた新治療の検討

① 同モデル発症後の免疫細胞の DAMP 受容体発現を解析する

② 改善後に DAMP または核酸分解酵素阻害剤を投与時の慢性化について検討する

(3) インスリン抵抗性と AIH 病態の関連の解析

① IR 状態にある ob/ob マウスを用い AIH モデルを作製した際の免疫動態を解析する

② 白色脂肪組織移植したマウスで AIH モデル作製時の発症後の IR 状態、脂肪組織内免疫細胞浸潤を検討、肝炎慢性化刺激を加えた際も同様の検討を行う。

4. 研究成果

(1) AIH 発症時の NKT1/NKT2 バランス動態と他の免疫動態との関連の解析

① NKT1/NKT2 バランスの解析

肝炎期、改善期の肝臓を pronase/collagenase 処理しリンパ球分離液を用いた比重遠心により肝内浸潤単核球を得て、NK1.1 抗体と NKT1 が優先的に使用する V α 14 に対する抗体、NKT2 が優先的に使用する V α 3.2 に対する抗体を用いた FACS 解析により各病期における肝内 NKT1/NKT2 細胞数比を定量的に評価し、同抗体を用い免疫組織化学検討により NKT1、NKT2 の肝内分布について検討した。

その結果、肝炎期には NKT1 細胞数が多く、一方、回復期には NKT2 細胞数が多く、免疫組織化学的検討においても、NKT1、NKT2 の肝内分布は、肝炎期には NKT1 細胞、回復期には NKT2 細胞が優位であることが明らかとなった。以上より、肝炎の病態形成には NKT1 細胞が、その回復には NKT2 細胞が関与している可能性が示された。

②Treg、CTL との関連の解析

CD25・Foxp3 抗体、CD8 抗体を用いた FACS 解析により肝内 Treg、CD8 を定量的に評価し、NKT1/NKT2 バランスとの関連を検討し、さらに免疫組織化学検討により、NKT1、NKT2 と Treg、CD8 の位置関係について検討した。

その結果、NKT1/NKT2 バランスと肝内 Treg、CD8 細胞浸潤の程度の間には、なんらの有意な相関を認めることはなかった。以上の結果から、NKT1/NKT2 バランスは肝内 Treg、CD8 細胞の動態には影響を及ぼさないことが明らかにされた。

③NKT1/NKT2 バランス形成への Hedgehog シグナルの関与

Hedgehog シグナル関連分子の免疫染色が上手くいかず、残念ながら本研究では解明に至らなかった。

(2) AIH 慢性化への DAMP の関与の解析

①AIH 発症時の肝内免疫細胞の DAMP 受容体発現

肝炎期、改善期の肝内浸潤 DC、CD4、CD8、NKT1、NKT2、Treg の DAMP 受容体 (HMGB1 : RAGE、TLR2・4、核酸 : TLR9) 発現を FACS、RT-PCR により蛋白、遺伝子レベルで検討した。肝炎期では、CD4、CD8 細胞の RAGE、TLR4、TLR9 発現の増強を認めしたが、TLR2 発現の変化はなかった。NKT1、NKT2 細胞ではいずれも RAGE、TLR9 の発現増強を認めしたが、TLR2、TLR4 の発現増強は見られなかった。また Treg においては RAGE、TLR9 の発現増強を認めしたが、TLR2、TLR4 の発現増強は見られなかった。これらの発現変化は蛋白、遺伝子いずれのレベルにおいても認められ、両者間の差異は見られなかった。

一方、改善期には、CD4、CD8 で見られた RAGE、TLR4、TLR9 発現増強は減少してい

た。また NKT1 細胞における RAGE、TLR9 の発現増強が減少したのに対し、NKT2 細胞におけるそれら分子の発現増強は維持されていた。Treg における RAGE、TLR9 の発現増強は維持されていた。

また同じ方法で炎症性サイトカイン (IFN γ 、IL-6、IL-17)、抗炎症性サイトカイン (IL-10、TGF β) による各免疫細胞の DAMP 受容体発現への影響を検討したところ、CD4、CD8 細胞においては IFN γ による RAGE、TLR4、TLR9 発現増強が見られたが、TLR2 発現増強は見られなかった。しかし IL-17 は CD4、CD8 細胞におけるこれら分子の発現にはなんら影響を及ぼさなかった。一方、IL-10 はこれら分子の発現増強を軽減したが、TGF β はなんら影響を及ぼさなかった。

②改善後に DAMP または核酸分解酵素阻害剤投与時の慢性化について検討

この方法により慢性炎症状態を誘導することはできなかった。

(3) IR にともなう免疫環境変化が AIH の発症進展、免疫病態に及ぼす影響の解析

①ob/ob マウスで作製した AIH モデルの病像、免疫病態解析とコントロールとの比較 :

IR 状態にある C57BL/6・ob/ob マウスを用いて前年度と同様の AIH モデルを作製、血清 ALT、肝組織像を経時的に検討し野生型 C57BL/6 で作製したモデルと比較して、IR の存在が AIH 発症に及ぼす影響を解析した。その結果、IR マウスでは野生型に比較して血清 ALT 値の有意な上昇を認めしたが、肝内の炎症増強像はみられなかった。また IR マウスでは野生型にみられた自然改善が見られず、IR が肝炎慢性化に影響する可能性が示唆された。さらに肝内浸潤 CD4 の肝細胞反応性、サイトカイン産生プロファイル、CD8 の肝細胞障害性、CD25/Foxp3 陽性 Treg 数と CD25 陰性細胞増殖抑制能、NKT 数とサイトカイン産生プロファイルを経時的に分析し IR による肝内免疫環境変化を検討したところ、CD4、CD8 の量的、質的動態には変化がないが、CD4 による Th1 サイトカイン産生が増強していた。また NKT 細胞数が増加し、その Th1 系サイトカイン産生も増強していた。

②IR 改善剤投与による AIH 治療効果 :

上記検討で ob/ob マウスで AIH の増悪が見られたため、IR 改善作用を持つ PPAR γ アゴニスト投与による肝炎改善、肝内免疫環境改善効果を検討したところ、ALT 値の若干の改善が見られたが、CD4 による Th1 サイトカイン産生増強、NKT 細胞数増加、その Th1 系サイトカイン産生増強には PPAR γ アゴニストはなんらの影響も及ぼさなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Nakano M Takahashi H et al. (他 6 名) Intrahepatic activated NKT cell has a significant role to exacerbate the hepatitis in experimental autoimmune hepatitis model. Clin Exp Immunol. 査読有 170 2012 274-282 doi: 10.1111/j.1365-2249.2012.04664.x.
- ② Nakamura M,,, Takahashi H,,, et al. (他 32 名) Genome-wide Association Study Identifies TNFSF15 and POU2AF1 as Susceptibility Loci for Primary Biliary Cirrhosis in the Japanese Population. Am J Hum Genet. 査読有 90 2012 721-728 doi: 10.1016/j.ajhg.2012.08.010.
- ③ Takahashi H, Zeniya M. Acute presentation of autoimmune hepatitis: Does it exist? A published work review. Hepatol Res. 査読有 41 2011 498-504 doi: 10.1111/j.1872-034X.2011.00808.x.
- ④ Zeniya M. Takahashi H Characteristics of autoimmune hepatitis in the Asia-Pacific Region: historical review. 査読有 Hepatol Int 6 2012 342-349 doi: 10.1007/s12072-011-9313-8
- ⑤ 高橋宏樹 銭谷幹男 自己免疫性肝炎の診断におけるスコアリングシステムの位置付け日本消化器病学会誌 査読有 108 2011 1938-1844
- ⑥ Saeki C. Takahashi H. et al. (他 4 名) Accumulation of functional regulatory T cells in actively inflamed liver in mouse dendritic cell-based autoimmune hepatic inflammation Clin Immunol 査読有 135 2010 155-165 doi: 10.1016/j.clim.2009.12.002.
- ⑦ Zeniya M. Takahashi H. et al. (他 8 名) Significance of interferon- β for the treatment of hepatitis C virus infection in hemodialyzed patients. Hepatol Res. 査読有 40 2010 852-869 doi: 10.1111/j.1872-034X.2010.00693.x.
- ⑧ Satoh K, Takahashi H, et al. (他 4 名) Natural killer cells target HCV core proteins during the innate immune response in HCV transgenic mice. J Med Virol 査読有 82 2010 1545-1553 doi: 10.1002/jmv.21859.

[学会発表] (計 16 件)

- ① 高橋宏樹 他 自己免疫性肝炎軽症例の臨床像と治療 2013 日本消化器病学会総会 2013 年 3 月 22 日 鹿児島

- ② Saeki C Takahashi H et al. High levels of microRNA-155 in CD4+T cells participate in the Th1 response and accumulation of intrahepatic regulatory T cells in autoimmune hepatitis. 2012 AASLD Annual Meeting 2012 年 11 月 7 日 Boston MA USA
- ③ Nakagawa R Takahashi H et al. microRNAs of CD4+ T cells are associated with immunological processes in primary biliary cirrhosis. 2012 AASLD Annual Meeting 2012 年 11 月 7 日 Boston MA USA
- ④ 高橋宏樹 他 ステロイド治療抵抗性自己免疫性肝炎例の臨床像の検討 2012 J-DDW 日本肝臓学会大会 2012 年 10 月 12 日 神戸
- ⑤ 中野真範 高橋宏樹 他自己免疫性肝炎の臨床像、治療反応性に発症年齢が及ぼす影響の検討 2012 日本肝臓学会総会 2012 年 6 月 4 日 金沢
- ⑥ 高橋宏樹 他 自己免疫性肝炎における性差の検討: 男性症例は注意深く治療、経過観察する必要がある 2012 日本肝臓学会総会 2012 年 6 月 4 日 金沢
- ⑦ 佐伯千里 高橋宏樹 他 自己免疫性肝炎の肝内 miRNA 発現プロファイルと病態との関連の解析 2012 日本肝臓学会総会 2012 年 6 月 4 日 金沢
- ⑧ 鳥巢勇一 高橋宏樹 他 ウルソデオキシコール酸単独治療が奏効した自己免疫性肝炎症例の臨床像の検討 2012 日本肝臓学会総会 2012 年 6 月 4 日 金沢
- ⑨ Takahashi H et al. Interactions among liver infiltrated CTL, Treg and NKT cell from spleen participated in the pathogenesis of experimental autoimmune hepatitis. 2012 EASL Annual Meeting 2012 年 4 月 21 日 Barcelona Spain
- ⑩ Takahashi H et al. Antinuclear antibody screening in AIH should be performed by indirect fluorescent immunoassay but not by enzyme-linked immunosorbent assay. 2011 AASLD Annual Meeting 2011 年 11 月 5 日 San Francisco CA USA
- ⑪ Nakano M Takahashi H et al. Activated NKT cells potentiate cytotoxic T cell-mediated autoimmune hepatic inflammation. 2011 AASLD Annual Meeting 2011 年 11 月 5 日 San Francisco CA USA
- ⑫ 高橋宏樹, 佐伯千里 他 自己免疫性肝炎の病態形成と自己反応性 T 細胞、NKT 細胞、制御性 T 細胞の動態の関連 2011 J-DDW 日本肝臓学会大会 2011 年 10 月 21 日 福岡
- ⑬ 高橋宏樹 他 自己免疫性肝疾患における B 細胞のサイトカイン産生動態と病態との関連 2011 日本肝臓学会総会 2011

- 年 6 月 3 日 東京
- ⑭ 中野真範 高橋宏樹 他 自己免疫性肝
傷害を惹起する自己反応性 CD8+T 細胞
の活性化と肝内誘導には肝内活性化
NKT 細胞が関与する 2011 日本肝臓学
会総会 2011 年 6 月 3 日 東京
- ⑮ 中野真範 高橋宏樹 他 自己免疫性肝
炎の病態形成への肝内 NKT 細胞の関与
2011 日本消化器病学会総会 2011 年 5 月
7 日 東京
- ⑯ Takahashi H et al. Insulin resistance was
involved in the pathogenesis of autoimmune
hepatitis without the relation to prednisone
therapy. 2010 AASLD Annual Meeting
2010 年 11 月 3 日 Boston MA USA

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋宏樹 (HIROKI TAKAHASHI)
東京慈恵会医科大学・医学部・講師
研究者番号：80256403

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：